



Actes des journées coton du Cirad-ca

Montpellier, du 20 au 24 juillet 1998

**Programme Coton
Cirad-ca
Juillet 1998**



IDENTIFICATION DU GENE CODANT POUR L'ACÉTYLCHOLINESTERASE CHEZ LE PUCERON *APHIS GOSSYPYII* (Glov.)

MENOZZI Philippe,
CIRAD-CA, Programme Coton, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex, France

Introduction

Le puceron du cotonnier *Aphis gossypii* (Glov.) est un ravageur cosmopolite qui occasionne de sévères dégâts sur de nombreuses plantes cultivées (Leclant and Deguine, 1994). Les stratégies de lutte sont principalement basées sur l'emploi d'insecticides chimiques tels que les organo-phosphorés et les carbamates qui inhibent l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme indispensable dans la transmission de l'influx nerveux. Si de nombreuses études biochimiques ont été réalisées sur des insectes, les travaux au niveau moléculaire concernant l'AChE restent limités à quatre espèces de Diptères : la drosophile *Drosophila melanogaster*, la mouche domestique *Musca domestica* et deux moustiques *Anopheles stephensi* et *Aedes aegypti* et à un seul Coléoptère, le doryphore *Leptinotarsa decemlineata*. Par ailleurs, ont été recensés depuis plusieurs années des cas de résistance à ces deux familles d'insecticide chez *A. gossypii* (Amiot, 1993 ; Hollingsworth *et al.*, 1994) et dont le principal mécanisme est la modification de l'acétylcholinestérase (Silver, 1995 ; Villatte, 1995 ; Delorme *et al.*, 1997) par mutation d'un ou plusieurs acides aminés au niveau du site actif de l'enzyme, comme cela a été montré chez la drosophile (Fournier *et al.*, 1992). L'identification des mutations susceptibles d'être impliquées dans la résistance aux insecticides chez le puceron du cotonnier nécessite au préalable l'identification du gène codant pour cette enzyme. Dans le présent document sont présentées les techniques de biologie moléculaire qui ont été utilisées pour identifier ce gène.

L'acétylcholinestérase : structure et fonctions

Cette enzyme a été étudiée chez plusieurs espèces de vertébrés (principalement le poisson torpille, en raison de l'abondance de l'AChE dans ses organes électriques) et chez certains invertébrés comme la drosophile et la mouche domestique (Fournier *et al.*, 1987; Toutant *et al.*, 1988), le nématode *Caenorhabditis elegans* (Johnson and Russell, 1983) et plus récemment la pieuvre *Sepia officinalis* (Talesa *et al.*, 1993). Chez les insectes, l'enzyme est très stable et peu représentée (moins de 0,1%) (Fournier *et al.*, 1987). Elle est localisée au niveau du système nerveux central et la forme majoritaire est un dimère amphiphile (Fournier *et al.*, 1988). Chaque monomère comprend deux sous-unités reliées entre elles par une liaison faible: une sous-unité de 16 kd et une sous-unité de 55 kd qui porte d'une part une ancre glycolipidique assurant la fixation de l'enzyme sur les membranes pré et post-synaptiques et d'autre part le site actif de l'enzyme. Les 2 monomères sont reliés entre eux de manière

covalente par un pont disulfure. La sous-unité contenant le site actif de l'enzyme est constituée d'une nappe de feuillets β et d'hélices α .

L'AChE joue un rôle fondamental dans la transmission de l'influx nerveux en hydrolysant dans les synapses cholinergiques, l'acétylcholine. Ce neurotransmetteur, à l'arrivée de l'influx nerveux, active les récepteurs nicotiniques (les canaux ioniques), entraînant ainsi une dépolarisation de la membrane post-synaptique et c'est l'élimination par l'enzyme du neurotransmetteur qui permet la repolarisation de la membrane au niveau du site actif. L'hydrolyse de l'acétylcholine s'effectue en deux étapes principales: libération de la choline en même temps qu'une acétylation de l'enzyme puis déacétylation de l'enzyme qui est ainsi régénérée.

Mode d'action des insecticides organophosphorés et carbamates

Les insecticides organophosphorés et carbamates sont des analogues de l'acétylcholine. Ils agissent en phosphorylant et en carbamylant la sérine du site actif mais la régénération de l'enzyme n'a pas lieu ou est très lente. L'enzyme phosphorylée ou carbamylée ne peut donc plus remplir sa fonction de catalyse de l'acétylcholine. Celle-ci n'est plus métabolisée et demeure fixée au récepteur. La polarisation de la membrane post-synaptique n'a pas lieu, ce qui bloque toute transmission nerveuse et entraîne à terme la mort de l'organisme intoxiqué.

Structure du gène codant pour l'acétylcholinestérase

Chez les insectes, l'organisation du gène codant pour l'AChE n'est connue à ce jour que chez la drosophile et le moustique *Anopheles stephensi*. Chez ces deux espèces, la structure de l'ADN génomique est connue. Chez la drosophile, le gène codant pour cette enzyme est localisé sur le chromosome 3 (Hall and Kankel, 1976) et sa séquence a été déterminée (Hall and Spierer, 1986; Fournier *et al.*, 1989). Il comporte 10 exons (la taille de la partie codante est de 1950 pb) séparés par des introns de longueurs variables et distribués sur 34 kb. La séquence peptidique de la partie codante présente 31% d'homologie avec celle du poisson torpille. Chez *A. stephensi*, le gène comprend 10 exons distribués dans seulement 3 Kb (Malcolm *et al.*, 1990) et la séquence déduite de la protéine présente 69% d'homologie avec celle de la drosophile et 38% avec celle du poisson torpille (Hall and Malcolm, 1991). Dans le cas de la drosophile, les techniques d'identification ont été la «marche sur le chromosome» (Bender *et al.*, 1983), ce qui a permis de cartographier le gène, puis le criblage d'une banque d'ADN génomique avec une sonde (clone contenant un fragment d'ADN génomique de drosophile). Pour *A. stephensi*, seul le criblage d'une banque d'ADN génomique, avec comme sonde un fragment cloné d'ADNc codant pour l'AChE de drosophile, a été nécessaire.

Chez le doryphore *Leptinotarsa decemlineata* (Zhu and Clark, 1995) et chez le moustique *Aedes aegypti* (Anthony *et al.*, 1995), seul l'ADNc codant pour l'AChE a été séquencé. Chez ces insectes, la technique d'identification a été le criblage d'une banque d'ADNc avec un fragment d'ADNc amplifié par PCR puis cloné.

La séquence est partiellement connue chez un autre moustique: *Culex pipiens* (Bourguet, 1996). Elle a été obtenue en séquençant des fragments d'ADNc amplifiés par PCR. Chez cet insecte, il a été mis en évidence l'existence de 2 acétylcholinestérases qui possèdent des

propriétés catalytiques et électrophorétiques différentes, ce qui laisse supposer qu'elles sont codées par 2 gènes différents (Bourguet *et al.*, 1996). Chez les nématodes, il existe 3 gènes codant pour des AChEs à propriétés catalytiques différentes (Johnson *et al.*, 1988 ; Arpagaus *et al.*, 1994).

Les séquences peptidiques déduites des séquences nucléotidiques du gène présentent chez les insectes environ 30% d'homologie avec celles des vertébrés (Bourguet, 1996) mais quelle que soit l'espèce, de nombreux acides aminés sont conservés, soit en position isolée soit groupés en peptides (« boîtes »). Certains de ces acides aminés sont impliqués dans les fonctions essentielles de l'enzyme. Au niveau du site catalytique de l'enzyme où a lieu la réaction enzymatique et qui est situé au fond d'une gorge d'environ 20Å de profondeur (Sussman *et al.*, 1991), trois acides aminés formant la triade catalytique: la sérine S200, (le nombre 200 fait référence à la position de cet acide aminé dans la séquence de l'enzyme chez le poisson torpille), le glutamate E327 et l'histidine H440 sont conservés et jouent un rôle majeur dans la réaction enzymatique. Il en est de même pour la phénylalanine F290 située dans la « poche acyle » au niveau de la gorge et qui joue un rôle important dans la spécificité du substrat. D'autres acides aminés aromatiques sont également conservés: les tryptophanes W84, situé au niveau du site catalytique responsable de la reconnaissance de la partie choline du substrat et W279, situés sur le site périphérique à l'entrée de la gorge et dont le rôle serait de participer à la fixation du substrat puis sa projection au fond de la gorge. Six cystéines: C67, C94, C254, C265, C402 et C521 sont également conservées quelle que soit l'espèce. Ces cystéines sont impliquées dans les ponts disulfure intra-chaînes et assurent la stabilité structurelle de la protéine.

Matériel et Méthodes

La stratégie suivante a été adoptée pour identifier le gène codant pour l'AChE *d'A. gossypii* : elle a consisté à séquencer dans un premier temps des fragments d'ADNc, amplifiés par PCR, situés dans la partie centrale du gène. Dans un deuxième temps, les extrémités 5' et 3' ont été recherchées. Ces travaux ont été menés sur une souche originaire de Pernes les Fontaines (Provence), résistante au pyrimicarbe et en élevage au Laboratoire Mode d'Action des Insecticides et Phénomènes de Résistance de l'Unité de Phytopharmacie de l'INRA de Versailles.

A. Partie centrale du gène

Extraction de l'ARN total :

l'ARN total a été extrait d'environ 20 mg de larves en utilisant le RNeasy mini kit (Qiagène).

Synthèse de l'ADNc :

le kit de Pharmacia Biotech « first-strand cDNA synthesis » a été utilisé selon la technique du multiamorçage au hasard avec un mélange d'héxanucléotides pour l'obtention d'ADNc simple brin.

Polymerase Chain Reaction (PCR) :

Des fragments amplifiés ont été obtenus par PCR (sur un thermocycleur Thermojet d'EUROGENTEC) en testant différents couples d'amorces spécifiques (dégénérés ou non) du

gène codant pour l'AChE (à partir de boîtes conservées). Les conditions PCR ont été les suivantes : 35 cycles de 10 secondes à 94°C, 30 secondes à 50°C, 90 secondes à 72°C. Plusieurs couples d'amorces ont été testés mais celui qui a donné des fragments amplifiés de taille attendue est F1new - B5 :

Amorce F1new (sens):	5'	GGC	GAA	GAA	ATG	TGG	AAC	CC	3'
			A	G			T		
séquence peptidique		G	E	E	M	W	N		
séquence pept. torpille		G	S	E	M	W(84)	N		
séquence pept. drosop.		G	E	E	I	W	N		
Amorce B5 (reverse):	3'	ACC	CCG	CTC	ACC	TAC	CCG	CAC	GAC
séquence peptidique :		W	G	E	W	M	G	V	L
séquence pept. torpille :		W	P	E	W	M	G	V	I
séquence pept. drosop. :		W	G	E	W	M	G	V	L

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume unitaire de 50 µl contenant un tampon (75mM Tris HCl pH9, 20 mM (NH₄)₂SO₄ ; 0,01% (W/V) Tween 20), 1,5 mM MgCl₂, 0,25 mM dNTP, 17 pmoles de chaque amorce, 0,5 U de Taq Polymerase (Goldstar d'Eurogentec)

Vérification par SOUTHERN :

Les fragments amplifiés ont été transférés sur membrane nylon (Hybond-N+, d'Amersham) après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%. 2 sondes ont été utilisées le plasmide recombinant PX contenant le gène codant pour l'AChE de drosophile et l'amorce reverse conservé et dégénérée G1 new (3' T CAT [G,A]AA ICC ACC ICC [G,A]TA GAT CC 5').

La sonde « PX » a été marquée au ³²P avec le kit « multiprime DNA labelling system » d'Amersham et l'amorce G1 new (17 pmoles) l'a été avec 20 unités de T4 kinase de Biolabs. Après hybridation, la membrane a été lavée en condition de faible stringence (30 minutes à 65°C, 2% SSPE, 0,2% SDS) puis de forte stringence (30 minutes à 65°C, 0,2% SSPE, 0,2% SDS) suivi d'une exposition de 48 heures à -80°C.

Clonage et séquençage :

Les fragments choisis ont été purifiés par électroélution en présence de NaOAc 3M puis précipités dans EtOH 95° à -20°C après traitement au phénol/chloroforme. Les fragments ont été insérés (200 ng) dans 50 ng du vecteur PGEM-T (Promega) à l'aide de 3U de T4 DNA ligase (Promega). Ce vecteur est résistant à l'ampicilline et possède au point d'insertion le gène codant pour une des deux sous-unités de la β-galactosidase. Les produits de ligation ont été introduits par choc électrique ou thermique, après élimination des sels de ligation, dans la bactérie TG1. Les colonies bactériennes ont été étalées sur boîtes d'Agar McCONKEY contenant 400 µg/ml d'ampicilline. Les colonies blanches (celles n'ayant pas exprimé la β-galactosidase) ont été criblées directement par PCR et aussi par digestion enzymatique (SphI-SalI, SphI-PstI, SacII-SacI) des minipréparations de plasmide et visualisation par électrophorèse du produit de digestion et du produit PCR sur gel d'agarose 0,8%.

Le séquençage, selon la technique de Sanger (T7 sequencing kit de Pharmacia Biotech avec α-dATP ³⁵S) a été réalisé sur des plasmides simples brins obtenus à l'aide du phage M13-KO7 à partir des colonies bactériennes positives. Les séquences ont été visualisées sur un

autoradiogramme après électrophorèse sur gel 8% acrylamide-0,2% bisacrylamide-50% urée ou bien déterminées par Genome Express.

B. Extrémité 3' du gène

Extraction de l'ARNm :

L'ARNm a été extrait de l'ARN total par contact avec de la cellulose oligo-dT puis élution dans 100 µl d'une solution 10 mM Tris, 1 mM EDTA, chauffée à 70°C. Le surnageant a été précipité dans EtOH 95° à -20°C en présence de NH₄OAc et repris dans 30 µl d'eau.

Synthèse de l'ADNc :

L'ADNc simple brin a été obtenu à l'aide du kit de Pharmacia Biotech « first-strand cDNA synthesis » en utilisant l'amorce NotI-d(T)₁₈ qui s'hybride sur la queue polyadénylé de l'ARNm.

PCR :

3 amorces ont été employées (17 pmoles par tube). Dans une première PCR, l'amorce sens QYS a été employée seule (40 cycles). Une deuxième PCR a été effectuée avec le produit PCR précédent dilué au 1/10 en présence du couple d'amorces suivant : FTH (sens et interne par rapport à QYS) et dTSPEC (reverse, s'hybridant sur NotI-d(T)₁₈).

Amorce sens **QYS** : 5' CAG TAT TCG GGA TGG GAA 3'
séquence peptidique : Q Y S G W E

Amorce sens **FTH** : 5' TTC ACT CAC AGG ACC GAC 3'
séquence peptidique : F T H R T D

Amorce reverse **dTSPEC** : 3' G GAC GCC GGC GCT TAA GAA GGT CAA 5'

Clonage et séquençage :

Le clonage du fragment amplifié QYS-dTSPEC a été fait dans les mêmes conditions que pour la partie centrale du gène.

C. Extrémité 5' du gène

Synthèse de l'ADNc :

La technique du « cap finder » développée par Clontech a été utilisée pour obtenir le premier brin d'ADNc. La réaction de rétrotranscription a été effectuée en présence à la fois de l'oligonucléotide « SMART » (Clontech) qui se fixe sur la coiffe de l'ARNm et de l'amorce GDL, reverse et spécifique, située dans la partie centrale du gène codant pour l'AcHé d'*A. gossypii*.

PCR, clonage et séquençage :

2 amorces (17 pmoles par tube) ont été employées dans une première PCR : « 5'PCR » (Clontech), sens et spécifique de SMART, et GDL. Elle a été suivie par d'une PCR semi-interne avec 5'PCR-MSGT. Le produit PCR a été purifié par électroélution, cloné et séquencé comme précédemment.

Amorce reverse **GDL** : 3' CCG CTA AAT AAC CGC CGA 5'
séquence peptidique : G D L L A A

Amorce reverse **MSGT** : 3' TAC AGG CCA TGA AGC TGT 5'
séquence peptidique : M S G T S T

Résultats et Discussion

Différents couples d'amorces, dont la séquence correspondait à des séquences conservées entre différents organismes vertébrés et invertébrés, ont été testés et le couple F1new-B5 a permis d'identifier 1143 pb de la partie centrale du gène après vérification par Southern. La connaissance de cette séquence nucléotidique nous a permis d'élaborer d'autres amorces utilisées pour séquencer les extrémités 5' et 3' du gène qui possèdent moins de séquences conservées. L'extrémité 3' a été séquencée dans sa totalité jusqu'au codon stop (TAA), soit 426 pb en aval de l'amorce B5. La technique du cap finder n'a pas permis d'identifier complètement l'extrémité 5' jusqu'au codon d'initiation. Seuls 78 pb en amont de F1new (sur un total estimé à environ 350 pb) ont pu être ainsi séquencés. Il semblerait que le « cap finder » n'ait pu s'hybrider spécifiquement au niveau de la coiffe mais plus en aval.

Ainsi, 1647 pb correspondant à 549 acides aminés ont pu être séquencés, ce qui représente environ 86% du gène (figure 1) avec un pourcentage d'homologie de 50 % avec celle de la drosophile et de 56% avec celle du doryphore. Il semble que l'on ait bien identifié le gène codant pour l'AChE chez le puceron *A. gossypii* car d'une part on retrouve bien les acides aminés caractéristiques de l'acétylcholinestérase (triade catalytique, F290 de la poche acyle, site périphérique, les six cystéines assurant les ponts disulfures) et d'autre part on note une nette ressemblance du profil d'hydropathie de la séquence peptidique de l'AChE d'*A. gossypii* avec celui de la drosophile, avec notamment la présence d'un peptide hydrophobe en C-terminal (figure 2).

La stratégie adoptée n'a pas permis pour l'instant l'identification du gène complet. Le criblage d'une banque de cDNA aurait été la solution la plus adaptée mais les conditions d'élevage ne permettent pas actuellement de disposer d'une très grande quantité d'insectes (minimum de 2,5 g pour espérer obtenir 40 µg d'ARNm comme dans le cas du doryphore).

Pour espérer identifier la partie manquante du gène, deux techniques sont actuellement testées :

le RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) par adjonction sur l'extrémité 5' du cDNA, après reverse-transcription du mRNA correspondant avec un primer reverse spécifique, soit d'une séquence polydénylée grâce à une terminale transférase soit d'un oligonucléotide à l'aide d'une RNA ligase, selon le protocole établi dans « Current protocols in molecular biology » (Wiley Interscience)

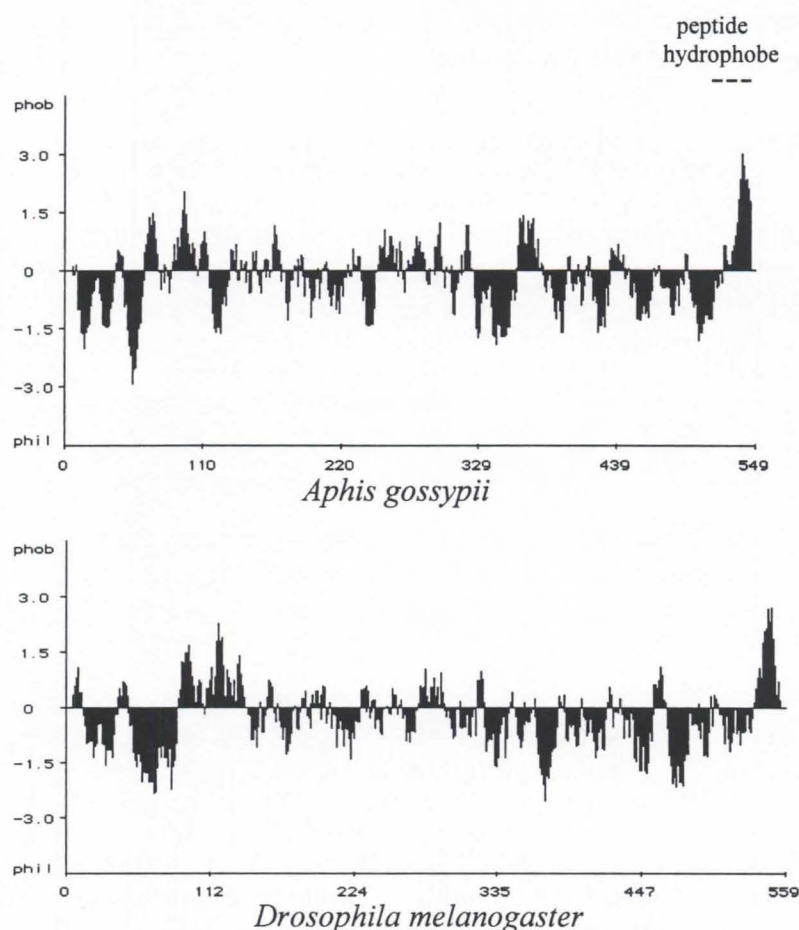
le cRACE (circular first-strand cDNA-mediated RACE) selon le protocole de Maruyama *et al.* (1995).

Nous espérons ainsi identifier rapidement la totalité du gène afin de pouvoir ensuite localiser les mutations impliquées dans la résistance.

Figure 1 : Comparaison de la séquence peptidique déduite du gène de l'AChE chez une souche résistante au pirimicarbe chez *A. gossypii* (Ag), *L. decemlineata* (Ld) et *D. melanogaster* (Dm). * : acides aminés (a.a.) communs chez les 3 insectes ; + : a.a. communs à Ag et Ld ; x : a.a. communs à Ag et Dm.. Les a.a. en gras sont ceux conservés quelle que soit l'espèce (au dessus est mentionnée leur position chez le poisson torpille). → : amorce sens ; ← : amorce reverse

Ag	M-GQLSILCL	FVTVCASVCG	YSWPSDETTT	KPSQFKNFHT	DPLVVETTS	LVRGYSKTVL	GREVHVFTGI
Ld	MAISCRQSRV	LPMSLPLPLT	IPLPLVLVLS	LHLSGVCVGI	DRLVVQTSSG	PVRGRSVTVQ	GREVHVYVTGI
			67		Flnew →84		94
Ag		WTGVLNATRL	PNT C YQERYE	YFPGFVGEEM	W DPNTKLSED	C LYLNIWIPK	
Ld	PFAKPPIEQL	RFKKPVPIDP	WHGILDATKQ	PNS C FQERYE	YFPGFEGEEM	W NPNTNISED	C LYLNIWVPQ
Dm	PYAKPPVEDL	RFRKPVPAEP	WHGVLDATGL	SAT C VQERYE	YFPGFSGEEI	W NPNTNISED	C LYINWAPA
			* *X* * * X	++X* *****	***** **++ * * * *	*** **++*+* *	
					←MSGT	←GDL	
Ag	KQRTTHSNNA	HHAKI-----	-----P	VLVWIYGGGY	MSGTSTLDIY	DGDLAATFD	
Ld	RLRIRH----	-----HAD	KPTIDRPKVP	VLIWIYGGGY	MSGTATLDVY	DADIIAATSD	
Dm	KARLRHGRGA	NGGEHPNGKQ	ADTDHLIHNG	NPQNTTNGLP	ILIWIYGGGF	MTGSATLDIY	NADIMAAVGN
	X * * X			* ++ *****	***+ ***X*	+ ** **++ +	
						200	
Ag	VMIASMQYRL	GAFGSLYLTP	ELPED-SDDA	PGNMGLWDQA	LAIKWIKENA	AAFGAEPETI	TLFDE S AGGG
Ld	VIVASMQYRL	GSFGFLYLNR	YFPRG-SED	PGNMGLWDQI	LAIRWIKDNA	AAFAGDPLDI	TLFGE S AGGG
Dm	VIVASFQYRV	GAFGFLHLAP	EMPSEFAEEA	PGNVGLWDQA	LAIRWLKDNA	HAFGGNPEWM	TLFGE S AGSS
	* **++**++	*X** **++ X	X * + +X	***+*****X	*** *+* **	***+ ***X +	*** **+++
					254		265
Ag	SVSVHLISPE	TRGMVKRGII	QSGTVNAPWS	YMTGERAVEI	AKKLLDDCN C	NSTSLDSNPI	GTMS C MRSVD
Ld	SISIHLSIPV	TKGLVRRGIM	QSGTMNAPWS	YMSGERAEQI	GKILIQDCG C	NVSLLENSPR	KVMD C MRAVD
Dm	SVNAQLMSPV	TRGLVKGMM	QSGTMNAPWS	HMTSEKAVEI	GKALINDCN C	NASMLKTNP	HVMS C MRSVD
	*X+ ***	*X* *X**+	**** **++	++X++*XX*	* * XX*	* * X*	*X***X**
	279	290			327		
Ag	ASTISKQ W N	SYSGIL F PS	APTVDGILLP	EHPLDMLAKA	NFSNIDILLG	SNLNE G TYFL	LYDFVDFDFR
Ld	AKTISLQ W N	SYSGIL F PS	TPTIEGVLLP	KHPMDMLAEG	DYEDMEILLG	SNHDE G TYFL	LYDFIDFFEK
Dm	AKTISVQ W N	SYSGIL F PS	APTIDGAFLP	ADPMTLMKTA	DLKDYDILMG	NVRDE G TYFL	LYDLIDYFDK
	* *** *	*****+***	X** X* +**	++ **** X	X*** ++	***** **++	***+ ***X
				QYS→			402
Ag	TSATALPREK	FVQIVNVIFK	DRTQLERDAI	IYQYSGWEKK	EVDDIYSNQK	QLSDVVADYF	FV C PTNLFAN
Ld	DGPSFLQREK	YHDIIDTIFK	NMSRLERDAI	VFQYTNEWHV	--HDGYLNQK	MIGDVVGDFY	FV C PTNNFAE
Dm	DDATALPRDK	YLEIMNNIFG	KATQAEREAI	IFQYTSWE-G	--NPGYQNQQ	QIGRAVGDFH	FT C PTNEYAQ
	xx*x**+	* X **+	xx+***++	X ** *	+ * *** X	++ **++	***** ++
		FTH→	←B5				440
Ag	IVSSRGARVY	YYFFTHRTDS	HLWGDWMGVL	H GDEMQYVFG	HPLNMSMPYN	ARERDLSIRI	MEAFTRFSLT
Ld	VAADRGMKVF	YYYFTHRTST	SLWGEWMGVI	H GDEVEYVFG	HPLNMSLQFN	SRERELSLKI	MQAFARFATT
Dm	ALAERGASVH	YYYFTHRTST	SLWGEWMGVL	H GDEIEYFFG	QPLNNSLQYR	PVERELGKRM	LSAVIEFAKT
	X *	** ***	*** **++X	***** **++	***+* X+	*** ** X+	+ **++ *
					521		
Ag	GTPVSDDIDW	PLYNESKPIY	HVWNAEMHV	---GYGPRAA	E CQFRNGFFP	KIAQALKETS	KTTCEDYPDS
Ld	GKPVTDCCNW	PLYTKDQPQY	FIFNADKNG-	--IGKGPRAA	A CAFWNDFLP	KLRDNGSGEE	AP-CVNTYLS
Dm	GNPAQDGEW	PNFSKEDPVY	YIFSTD--KI	EKLARGPLAA	R CSFWNDYLP	KVRSW----	GT-CDGD--S
	* **++ *	***+ *	++	***+X	* * * + *		*
Ag	MPTINENCTF	TSSFATVNPQ	ISFTIIFIV	LPAYGLF			
Ld	KIRSSSNELL	PPSTSLVLIW	IMTLLNAL				
Dm	GSASISPRLO	LLGIAALIYI	CAALRTKRVF				
	+	+ X +	+				

Figure 2 : Profils d'hydropathie de l'AChE chez *A. gossypii* et *D. melanogaster*.
(0 correspond au premier acide aminé identifié chez *A. gossypii*)



Bibliographie

- Amiot, E. 1993. *Contribution à l'étude du puceron Aphis gossypii à divers insecticides*. Mémoire de fin d'études D.E.A.. U.P.S. Toulouse, 26 p
- Anthony N., Rocheleau T., Mocelin G., Lee H.-J., ffrench-Constant R., 1995. Cloning, sequencing and functional expression of an acetylcholinesterase gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Letters*, 368, 461-465
- Arpagaus M., Fedom Y., Cousin X., Chattonet A., Bergé J.-B., Fournier D., Toutant J.-P., 1994. CDNA sequence, gene structure, and *in vitro* expression of *ace-1*, the gene encoding acetylcholinesterase of class A in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, 269, 13, 9957-9965

- Bender W., Spierer P., Hogness D. S., 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 168, 17-33
- Bourguet, D. 1996. *Mécanismes biochimiques, plasticité et évolution de la dominance. L'acétylcholinestérase et la résistance aux insecticides chez le moustique Culex pipiens*. Thèse. Université Montpellier II, 97 p.
- Bourguet D., Raymond M., Malcolm C.A., Toutant J-P., Arpagaus M., 1996. Existence of two acetylcholinesterases in the mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae). *J. of Neurochemistry*, 2115-2123
- Delorme R., Augé D., Béthenod M-T., Villatte F., 1997. Insecticide resistance in a strain of *Aphis gossypii* from southern France. *Pestic. Sci.*, 49, 90-96
- Fournier D., Cuany A., Bride J-M., Bergé J-B., 1987. Molecular polymorphism of head acetylcholinesterase from adult houseflies (*Musca domestica* L.). *J. Neurochem.*, 49, 1455-1461
- Fournier D., Bride J-M., Karch F., Bergé J-B., 1988. Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster* : identification of two subunits encoded by the same gene. *FEBS Lett.*, 238, 333-337
- Fournier D., Karch F., Bride J-M., Hall M. L. C., Bergé J-B., Spierer P., 1989. *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. *J. Mol. Biol.*, 210, 15-22
- Fournier D., Bride J-M., Hoffman F., Karch F., 1992. Acetylcholinesterase. Two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.*, 267, 14270-14274
- Fournier D., Mutero A., 1994. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108C, 19-31
- Hall L. M. C., Kankel D.R., 1976. Genetics of acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 83, 517-533
- Hall L. M. C., Spierer P., 1986. The *Ace* locus of *Drosophila melanogaster*: structural gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.*, 5, 2949-2954
- Hall L. M. C., Malcolm A. C., 1991. The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. *Cell. Mol. Neur.*, 11, 1, 131-141
- Hollingsworth R.G., Tabashnik B.E., Ullman D.E., Johnson M.W., Messing R., 1994. Resistance of *Aphis gossypii* (Homoptera, Aphididae), to insecticides in Hawaiï: spacial pattern and relation to insecticide use. *J. Econ. Entomol.*, 87(2), 293-300
- Johnson C. D., Russell R. L., 1983. Multiple molecular forms of acetylcholinesterase in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. of Neurochemistry*, 30-45
- Johnson C. D., Rand J. B., Herman R. K., Stern B. D., Russell R., 1988. The acetylcholinesterase gene of *C. elegans* : identification of a third gene (*ace-3*) and mosaic mapping of a synthetic lethal phenotype. *Neuron*, 1, 165-173
- Leclant F., Deguine J. P., 1994. Aphids (Hemiptera, Aphididae), in *Insect pests of cotton II*. Matthews and Tunstall Eds. 592 p.
- Malcolm A. C., Hall L. M. C., 1990. Cloning and characterization of a mosquito acetylcholinesterase gene. *Mol. Ins. Sc.*, 57-65
- Maruyama I. N., Rakow T. L., Maruyama H. I., 1995. CRACE : a simple method for identification of the 5' end of mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 3, 18, 3796-3797

- Silver A.R.J., 1995. A biochemical nature of pyrimicarb resistance in two glasshouse clones of *Aphis gossypii*. *Pest. Sci.*, 43, 21-29
- Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I., 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253, 872-878
- Talesa V., Principato G. B., Giovannini E., Grauso M., Rosi G., 1993. Evidence for a molecular polymorphism of cholinesterase in *Sepia officinalis* (Cephalopoda : Decapoda). *Comp. Biochem. Physiol.*, 106, B, 557-562
- Toutant J-P., Arpagaus M., Fournier D., 1988. Native molecular forms of head acetylcholinesterase from adult *Drosophila melanogaster*: quaternary structure and hydrophobic character. *J. Neurochem.*, 50, 209-218
- Villatte F., 1995. *Implication des estérases et de l'acétylcholinestérases dans la résistance aux organophosphorés et aux carbamates chez une souche française d'Aphis gossypii (Glover)*. Mémoire de stage de D.E.A., Université Paris 6, 27 p.
- Zhu K. Y., Clark J. M., 1995. Cloning and sequencing of a cDNA encoding acetylcholinesterase in colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25, 10, 1129-1138
- Zhu K. Y., Lee S. H., Clark J. M., 1996. A point mutation of acetylcholinesterase associated with azinphosmethyl resistance and reduced fitness in colorado potato beetle. *Pest. Biochem. Physiol.*, 55, 100-108